

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-196693

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47	Z N A	8318-4H		
A 6 1 K 38/00	A B U			
39/395	D			
		9281-4B	A 6 1 K 37/ 02	A B U
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数57 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-79035

(22) 出願日 平成6年(1994)4月18日

(31) 優先権主張番号 特願平5-99856

(32) 優先日 平5(1993)4月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平5-183107

(32) 優先日 平5(1993)7月23日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平5-298736

(32) 優先日 平5(1993)11月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 593081475

寒川 賢治

大阪府吹田市青山台3丁目50番D12-104

(71) 出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(72) 発明者 北村 和雄

宮崎県宮崎市下北方町塚原5783-11

(72) 発明者 寒川 賢治

大阪府吹田市青山台3丁目50番D12-104

(72) 発明者 松尾 壽之

兵庫県神戸市東灘区西岡本6丁目4-24

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アドレノメデュリン

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 血圧降下作用を有する新規ペプチドであるアドレノメデュリン、プロアドレノメデュリンのN末端部分のアミノ酸配列に対応し、カテコルアミン分泌抑制作用を有する新規ペプチドであるプロアドレノメデュリンN末端20ペプチド (proAM-N20)、Naチャンネル抑制作用を有するプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチド (proAM-N(10-20))、およびこれらをコードする遺伝子が提供される。さらに、これらのペプチドを製造する方法も提供する。さらに、このアドレノメデュリン、その断片、あるいはproAM-N20に対する抗体；該抗体を用いた試料中のアドレノメデュリンまたはproAM-N20の定量を行うためのアッセイも提供される。

【効果】 上記アドレノメデュリン、proAM-N20あるいはproAM-N(10-20)を含む血圧降下剤、血管拡張剤は、高血圧や心不全などの疾患の治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む血圧降下作用を有するペプチド。

【請求項2】 配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1の-73位のAlaから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】 配列表の配列番号1の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる請求項1に記載のペプチド。

【請求項5】 配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる請求項2に記載のペプチド。

【請求項6】 配列表の配列番号1の-73位のAlaから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる請求項3に記載のペプチド。

【請求項7】 C末端がアミド化されている、請求項1~6のいずれかに記載のペプチド。

【請求項8】 C末端にGlyが付加している、請求項1~6のいずれかに記載のペプチド。

【請求項9】 配列表の配列番号1の-94位のMetから91位のLeuまでのアミノ酸配列を含む請求項1に記載のペプチド。

【請求項10】 配列表の配列番号1の16位のCysと21位のCysとが、ジスルフィド結合している、請求項1~9のいずれかに記載のペプチド。

【請求項11】 前記ジスルフィド結合が $-CH_2-CH_2-$ 結合に置換されている、請求項10に記載のペプチド。

【請求項12】 配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまでのアミノ酸配列を含むペプチドであって、請求項2に記載のアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチド。

【請求項13】 配列表の配列番号1の1位のTyrから12位のArgまでのアミノ酸配列を含む請求項12に記載のペプチド。

【請求項14】 配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含むペプチドであって、請求項1または2に記載のアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチド。

【請求項15】 配列表の配列番号1の45位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む請求項14に記載のペプチド。

【請求項16】 配列表の配列番号1の40位のAsnから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む請求項14に記載のペプチド。

【請求項17】 C末端がアミド化されている、請求項14~16のいずれかに記載のペプチド。

【請求項18】 配列表の配列番号1の-64位のArgから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含むNaチャンネル抑制作用を有するペプチド。

【請求項19】 配列表の配列番号1の-73位のAlaから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含むカテコルアミン分泌抑制作用を有するペプチド。

【請求項20】 C末端がアミド化されている、請求項18または19に記載のペプチド。

10 【請求項21】 C末端にGlyが付加している、請求項18または19に記載のペプチド。

【請求項22】 配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含むペプチドであって、請求項19に記載のアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチド。

【請求項23】 配列表の配列番号1の-65位のPheから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含む請求項22に記載のペプチド。

【請求項24】 C末端がアミド化されている、請求項22または23に記載のペプチド。

20 【請求項25】 前記ペプチドを構成するアミノ酸配列のうちの少なくとも1個が標識化されている、請求項1~24のいずれかに記載のペプチド。

【請求項26】 放射性同位元素で標識されているTyrが付加されている、請求項1~24のいずれかに記載のペプチド。

【請求項27】 請求項1~24のいずれかに記載のペプチドをコードする、DNA配列。

【請求項28】 配列表の配列番号1の483位のAから602位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

30 【請求項29】 配列表の配列番号1の483位のAから605位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項30】 配列表の配列番号1の447位のTから602位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項31】 配列表の配列番号1の447位のTから605位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

40 【請求項32】 配列表の配列番号1の228位のGから602位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項33】 配列表の配列番号1の228位のGから605位のCまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項34】 配列表の配列番号1の165位のAから719位のTまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

50 【請求項35】 配列表の配列番号1の255位のCから287位のTまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

載のDNA配列。

【請求項36】 配列表の配列番号1の255位のCから290位のGまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項37】 配列表の配列番号1の228位のGから287位のTまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項38】 配列表の配列番号1の228位のGから290位のGまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項39】 配列表の配列番号1の264位のTから287位のTまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項40】 配列表の配列番号1の252位のTから287位のTまでの塩基配列を含む、請求項27に記載のDNA配列。

【請求項41】 請求項27～40のいずれかに記載のDNA配列を有する発現ベクター。

【請求項42】 請求項41に記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

【請求項43】 請求項1～17のいずれかに記載のペプチドを製造する方法であって、請求項42に記載の形質転換体を培養する工程、および生産されたペプチドを培養培地から回収する工程を包含する、方法。

【請求項44】 請求項43に記載のペプチドの製造方法であって、さらに、ペプチドのC末端をアミド化する工程を包含する、方法。

【請求項45】 請求項1～26のいずれかに記載のペプチドを認識する、抗体。

【請求項46】 配列表の配列番号1の1位のTyrから12位のArgまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項47】 配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項48】 配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項49】 配列表の配列番号1の45位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項50】 配列表の配列番号1の40位のAsnから52位のTyrまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項51】 配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項52】 配列表の配列番号1の-65位のPheから-54位のArgまでのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する、請求項45に記載の抗体。

【請求項53】 前記アミノ酸配列のC末端のカルボキシル基がアミド化されている、請求項48～52のいずれかに記載の抗体。

【請求項54】 請求項1～26のいずれかに記載のペプチドを含有する試料を、請求項45～53のいずれかに記載の抗体とともに、抗原抗体複合体を形成させる条件下でインキュベーションする工程；および該抗原抗体複合体の量を測定する工程を包含する、ペプチドの免疫学的測定法。

10 【請求項55】 請求項1～11および18～21のいずれかに記載のペプチドを有効成分とする、血圧降下剤、血管拡張剤、または心不全治療薬。

【請求項56】 請求項45～53のいずれかに記載の抗体を含む、請求項1～26のいずれかに記載のペプチドを免疫学的に測定するためのキット。

【請求項57】 さらに請求項1～26のいずれかに記載のペプチドを含む、請求項56に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

20 【産業上の利用分野】本発明は、血圧降下作用を有する新規ペプチドであるアドレノメデュリン(Adrenomedullin)、および該アドレノメデュリンのプロタンパク質の一部であり、カテコラミン分泌抑制作用を有するプロアドレノメデュリンN末端20ペプチド(Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide, proAM-N20)ならびにNaチャンネル抑制作用を有するプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチド(proAM-N(10-20))に関する。さらに詳細には、本発明は、ヒト褐色細胞腫から精製され得るアドレノメデュリン；アドレノメデュリン、proAM-N20およびproAM-N(10-20)の構造遺伝子；該遺伝子によりコードされるアドレノメデュリンおよびその前駆体タンパク質；該遺伝子を含む発現ベクター；該発現ベクターを有する形質転換体；該形質転換体を用いたアドレノメデュリン、proAM-N20およびproAM-N(10-20)の製造方法；アドレノメデュリンおよびproAM-N20に対する抗体；該抗体を用いた試料中のアドレノメデュリンおよびproAM-N20を定量するためのアッセイ；および該抗体の調製および該アッセイに有用なペプチドに関する。

【0002】

40 【従来の技術】哺乳類の循環系は、数種の神経およびホルモン因子を含む適切なメカニズムにより調節されている。脳ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)およびエンドセリンなどのような脈管作用性ペプチドは、心臓脈管系における重要な調節因子として知られている。このうちBNPおよびANPは、血圧、水電解質代謝調節に関与する可能性が示唆されている。

50 【0003】複雑な循環系の機構を解明するために、いまだに同定されていない脈管作用性ペプチドを発見することは重要である。特に、このような脈管作用性ペプチ

下のうち、例えば、高血圧性心肥大あるいは心不全の患者の診断や治療に有効な、血圧降下作用を有するペプチドを見いだすことが望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記従来の課題を解決するものであり、その目的は、血圧降下作用を有する新規なペプチドであるアドレノメデュリン、および該アドレノメデュリンのプロタンパク質の一部であり、カテコルアミン分泌抑制作用を有する新規なペプチドであるプロアドレノメデュリンN末端20ペプチド、ならびにNaチャンネル抑制作用を有する新規なペプチドであるプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチドを提供することにある。

【0005】本発明の他の目的は、該アドレノメデュリン、該proAM-N20および該proAM-N(10-20)をコードするDNA配列、該DNA配列を有する発現ベクター、該発現ベクターを有する形質転換体、および該形質転換体を用いたアドレノメデュリン、proAM-N20およびproAM-N(10-20)の製造方法を提供することにある。

【0006】本発明のさらに別の目的は、該アドレノメデュリンおよび該proAM-N20に対する抗体、該抗体を用いた試料中のアドレノメデュリンおよびproAM-N20を定量するためのアッセイ方法、および該抗体の調製および該アッセイに有用なペプチドを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】発明者らは、血圧降下作用を有するペプチドを得ようと種々の検討を行った。その結果、ヒト褐色細胞腫から血圧降下作用を有する新規なペプチドを単離し、該ペプチドの一次構造、および免疫学的性質を解明して、本発明を完成するに至った。

【0008】本発明のペプチドは、配列表の配列番号1の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含み、血圧降下作用を有する。

【0009】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。

【0010】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の-73位のAlaから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。

【0011】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる。

【0012】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる。

【0013】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の-73位のAlaから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなる。

【0014】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、C末端がアミド化されている。

【0015】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、C末端にGlyが付加している。

【0016】好ましい実施態様では、配列表の配列番号1の-94位のMetから91位のLeuまでのアミノ酸配列を含む。このうち、-94位のMetから-74位のThrまでは、シグナルペプチドであると思われる。

【0017】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の16位と21位のCysがジスルフィド結合している。

10 【0018】好ましい実施態様では、上記ペプチドは、配列表の配列番号1の16位と21位のCysによるジスルフィド結合-S-S-が-CH₂-CH₂-結合に置換されている。

【0019】本発明はまた、配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまでのアミノ酸配列を含み、配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチドに関する。例えば、配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまで、あるいは配列表の配列番号1の1位のTyrから12位のArgまでのアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのペプチドは成熟アドレノメデュリンのN末端付近の配列に対応する。これらは抗体の調製および該抗体を用いたアッセイに有用である。

【0020】本発明はまた、配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含み、配列表の配列番号1の13位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチドに関する。例えば、配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまで、配列表の配列番号1の45位のSerから52位のTyrまで、あるいは配列表の配列番号1の40位のAsnから52位のTyrまでのアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのペプチドは成熟アドレノメデュリンのC末端付近の配列に対応する。これらは抗体の調製および該抗体を用いたアッセイに有用である。

【0021】好ましい実施態様では、上記成熟アドレノメデュリンのC末端付近の配列に対応するペプチドは、C末端がアミド化されている。

【0022】本発明のさらに他のペプチドは、配列表の配列番号1の-64位のArgから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含み、このペプチドは、Naチャンネル抑制作用を有する。例えば、配列表の配列番号1の-73位のAlaから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含み、このペプチドは、カテコルアミン分泌抑制作用も有する。これらのペプチドは、プロアドレノメデュリンのN末端付近の配列に対応する。

【0023】好ましい実施態様では、上記プロアドレノメデュリンのN末端ペプチドは、C末端がアミド化されている。

【0024】好ましい実施態様では、上記プロアドレノメデュリンのN末端ペプチドは、C末端にGlyが付加している。

【0025】本発明はまた、配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含み、配列表の配列番号1の-73位のAlaから-54位のArgまでのアミノ酸配列を認識する抗体を産生させるペプチドに関する。例えば、配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまで、あるいは配列表の配列番号1の-65位のPheから-54位のArgまでのアミノ酸配列からなるペプチドであり、これらのペプチドはproAM-N20のC末端側の配列に対応する。これらは抗体の調製および該抗体を用いたアッセイに有用である。

【0026】好ましい実施態様では、上記proAM-N20のC末端側の配列に対応するペプチドは、C末端がアミド化されている。

【0027】上記ペプチドはまた、該ペプチドを構成するアミノ酸配列の少なくとも1個が標識化されていてもよい。

【0028】上記ペプチドはまた、放射性同位元素で標識されているTyrが付加されていてもよい。

【0029】本発明のDNA配列は、上記のいずれかに記載のペプチドをコードする。

【0030】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の483位のAから602位のCまでの塩基配列を含む。

【0031】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の483位のAから605位のCまでの塩基配列を含む。

【0032】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の447位のTから602位のCまでの塩基配列を含む。

【0033】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の447位のTから605位のCまでの塩基配列を含む。

【0034】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の228位のGから602位のCまでの塩基配列を含む。

【0035】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の228位のGから605位のCまでの塩基配列を含む。

【0036】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の165位のAから719位のTまでの塩基配列を含む。

【0037】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の255位のCから287位のTまでの塩基配列を含む。

【0038】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の255位のCから290位のGまでの塩基配列を含む。

【0039】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の228位のGから287位のTまでの塩基配列を含む。

【0040】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の228位のGから290位のGまでの塩基配列を含む。

【0041】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の264位のTから287位のTまでの塩基配列を含む。

【0042】好ましい実施態様では、上記DNA配列は、配列表の配列番号1の252位のTから287位のTまでの塩基配列を含む。

10 【0043】本発明の発現ベクターは、上記のいずれかに記載のDNA配列を有する。

【0044】本発明の形質転換体は、上記発現ベクターを宿主に導入して得られる。

【0045】本発明のペプチドを製造する方法は、上記形質転換体を培養する工程、および生産されたペプチドを培養培地から回収する工程を包含する。

【0046】好ましい実施態様では、上記ペプチドを製造する方法は、さらに、ペプチドのC末端をアミド化する工程を包含する。

20 【0047】本発明の抗体は、上記いずれかに記載のペプチドを認識する。

【0048】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の1位のTyrから12位のArgまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を、認識する。

【0049】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を、認識する。

30 【0050】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

【0051】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の45位のSerから52位のTyrまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

40 【0052】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の40位のAsnから52位のTyrまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

【0053】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

【0054】好ましい実施態様では、上記抗体は、配列表の配列番号1の-65位のPheから-54位のArgまでのアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

50 【0055】好ましい実施態様では、上記抗体は、C末

端のカルボキシル基がアミド化されているアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

【0056】好ましい実施態様では、上記抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【0057】本発明の免疫学的測定法は、上記のいずれかに記載のペプチドを含有する試料を、上記のいずれかに記載の抗体とともに、抗原抗体複合体を形成させる条件下でインキュベーションする工程；および該抗原抗体複合体の量を測定する工程を包含する。

【0058】本発明の血圧降下剤、血管拡張剤、または心不全治療薬は、上記のいずれかに記載のペプチドを有効成分とする。

【0059】本発明のキットは、上記のいずれかに記載のペプチドを免疫学的に測定するために、上記のいずれかに記載の抗体を含む。

【0060】好ましい実施態様では、上記キットは、さらに上記のいずれかに記載のペプチドを含む。

【0061】I. 定義

以下に、本発明を説明するうえで用いられる用語を説明する。

【0062】「アドレノメデュリン」とは、新規な、血圧降下作用を有するペプチドのことである。特に本発明で得られるヒト由来のアドレノメデュリンは、配列表の配列番号1の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。ブタ由来のアドレノメデュリンの場合、配列表の配列番号2の1位のTyrから52位のTyrまでのアミノ酸配列を含む。しかし、この配列に必ずしも限定されることはなく、当業者に公知の、アミノ酸の保存的な改変、あるいは欠損などのうち活性に影響を及ぼさない程度の改変を含むアミノ酸配列は、この語に含まれるものとする。このペプチドのC末端は、アミド化されていてもされていなくてもよい。

【0063】配列表の配列番号1の-94位のMetから91位のLeuまでのアミノ酸配列からなるペプチドはプロアドレノメデュリンと考えられ、シグナルペプチドがプロセッシングされた配列表の配列番号1の-73位のAlaから91位のLeuまでのアミノ酸配列からなるペプチドはプロアドレノメデュリンと考えられる。

【0064】「プロアドレノメデュリンN末端20ペプチド (proAM-N20)」とは、新規な、カテコラミン分泌抑制作用を有するペプチドのことである。特に本発明で得られるヒト由来のプロアドレノメデュリンN末端20ペプチドは、配列表の配列番号1の-73位のAlaから-54位のArgまでのアミノ酸配列からなる。「プロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチド (proAM-N(10-20))」とは、新規な、Na⁺チャンネル抑制作用を有するペプチドのことである。特に、本発明で得られるヒト由来のプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチドは、配列表の配列番号1の-64位のArgから-54位のArgまでのアミノ酸配列からなる。proAM-N20およびpr

oAM-N(10-20)の場合も、これらの配列に必ずしも限定されることはなく、当業者に公知の、アミノ酸の保存的な改変、あるいは欠損などのうち活性に影響を及ぼさない程度の改変を含むアミノ酸配列は、これらの語に含まれるものとする。これらのペプチドのC末端は、アミド化されていてもされていなくてもよい。

【0065】「C末端のアミド化」とは、ペプチドの修飾反応の1つをいい、ペプチドのC末端アミノ酸のCOOH基が、CONH₂の形態になることをいう。生体内で作動する多くの生理活性ペプチドは、はじめ分子量のより大きな前駆体タンパク質として生合成され、これが細胞内移行の過程で、C末端アミド化のような修飾反応を受けて成熟する。アミド化は、C末端アミド化酵素が、前駆体タンパク質に作用することによって、行われる。前駆体タンパク質においては、アミド化される残基のC末端側には常にGly残基が存在し、さらにC末端側に、例えばLys-ArgあるいはArg-Argなどの塩基性アミノ酸配列対が続いていることが多い(水野、生化学第61巻、第12号、1435~1461頁(1989))。

【0066】本明細書では、C末端がCOOHの通常のペプチドを、ペプチド[X-Y]と表し、C末端アミド化ペプチドを、ペプチド[X-Y]NH₂と表す。ここでXとYは、ペプチドの始まりと終わりのアミノ酸の位置を表す。

【0067】あるペプチドが、抗体と「免疫学的に反応性がある」とは、ペプチドに含まれている特異的なエпитープを抗体が認識することによって、抗体と結合することをいう。ペプチドが抗体と免疫学的に反応性であるか否かを決定する方法は、当該技術分野で公知である。特にELISAあるいはRIAのような方法が好適に用いられ得る。

【0068】II. 本発明に用い得る方法

本発明の実施においては、特に指示されない限り、当該分野で既知であるタンパク質の分離および分析法、組み換えDNA手法、および免疫学の手法が採用される。

【0069】以下に本発明に用い得る一般的方法を述べる。

【0070】(1) アドレノメデュリンの精製および構造分析

本発明のアドレノメデュリンの由来は限定されないが、例えばヒト褐色細胞腫あるいはブタ副腎髄質から得ることができる。

【0071】アドレノメデュリンの精製は、例えばまず、ヒト褐色細胞腫を破壊して得られる粗抽出物を、各種クロマトグラフィーにかけることによって行われ得る。その際、血小板cAMPの活性の上昇をモニターすることによって、目的のアドレノメデュリンを含むフラクションを得ることができる。

【0072】血小板cAMPの活性の上昇のモニターによるアッセイは、すでに、ヒト褐色細胞腫組織から、パソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド (VI

P) およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) (Kitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 185, 134-141 (1992)) などの生物学的に活性なペプチドを単離する際に用いられている。これらのペプチドは、強力な脈管弛緩因子として知られ、血小板膜上の特異的レセプターに結合して、細胞内cAMPを増加させると考えられている。このアッセイは、生物学的に活性なペプチドを研究するために良い手段であると考えられ、ヒト活性細胞腫組織抽出物中の脈管作用性ペプチドを検出し得ると発明者らが予測して採用したものである。

【0073】 このようにして得られる精製アドレノメデュリンの構造解析は、例えば気相アミノ酸配列分析等を用いて行う。

【0074】 (2) アドレノメデュリンの血圧降下作用の確認

上記(1)のようにして得られたアドレノメデュリンの血圧降下作用は、例えばラット脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) について報告されていると同様の方法 (Kitaら、Eur. J. Pharmacol., 202, 73-79 (1991)) により確認することができる。すなわち、ラットなどのような実験用動物に、麻酔をかけ、適当な方法でアドレノメデュリンを投与し、血圧交換機に接続された右頸動脈カテーテルから継続的に血圧をモニターして、投与前の血圧と比較することによって、確認できる。

【0075】 (3) アドレノメデュリンのcDNAのクローニングおよび配列決定

本発明のアドレノメデュリンをコードするDNAを含むcDNA断片のクローニングおよび配列決定方法を以下に例示する。本発明のアドレノメデュリンをコードするcDNAは、例えば、ヒト褐色細胞腫の全RNAからcDNAライブラリー (後述) を作成し、該ライブラリーをプローブを用いてスクリーニングし、得られた陽性クローンを、DNAシーケンス法により分析することにより、配列決定され得る。

【0076】 (A) DNAプローブの作成

アドレノメデュリンをコードするcDNAは、例えばヒト褐色細胞腫から得ることができる。そのためには、ヒト褐色細胞腫由来のcDNAライブラリーから、アドレノメデュリンのcDNAのクローニングを行うためのプローブが、例えば、次のようにして作成される。

【0077】 まず、上記(1)項で得られたアドレノメデュリンのアミノ末端のペプチド配列をもとに、直接的あるいは間接的に、プローブを作成することができる。

【0078】 間接的にプローブを作成する場合、例えば、上記アミノ末端のアミノ酸配列を基に、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 用のDNAプライマーを合成し、このプライマーを用いて、以下のようにして調製したPCR用の鋳型を増幅させて、スクリーニング用のプローブとし得る。このPCR用の鋳型として

は、例えばアドレノメデュリンが多く存在していることが考えられるヒト褐色細胞腫から得られるcDNAを用いることができる。このようなDNAは、例えば、ヒト褐色細胞腫から、グアニジウムチオシアネート法 (Chomczynski, P.ら、Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987)) によってRNAを抽出し、このRNAからcDNAを調製する方法により、得られる。RNAからのcDNAの調製は、まず、プライマーをRNAにアニーリングさせ、逆転写酵素により該プライマーからDNAを合成していくことにより、行われ得る。

【0079】 あるいは、このプローブは、ヒト以外の動物由来のアドレノメデュリンをコードするDNAから得ることもできる。発明者らが見いだしたブタ由来のアドレノメデュリンをコードするDNAを、ヒト由来のアドレノメデュリンをコードするDNAをスクリーニングするためのプローブとする方法は、以下の実施例に詳述する。

【0080】 このようにして得られたプローブを標識して、以下のスクリーニングに用いることができる。

20 【0081】 (B) ライブラリーのスクリーニング
ヒト褐色細胞腫組織から、cDNAライブラリーを、当該技術分野で公知の方法によって、作成できる。cDNAライブラリーの調製方法は、例えば、Hyunh, V. T. ら、DNA Cloning Techniques - A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984)、ならびにOkayamaおよびBerg, Mol. Cell Biol. (1983) 3:280-289に開示されている。

30 【0082】 調製したcDNAライブラリーを適当な条件下で、上記(A)のようにして得られたプローブを用いてスクリーニングし、目的のアドレノメデュリンをコードするcDNAを含む、陽性クローンを得る。

40 【0083】 (C) cDNAの塩基配列の決定
上記(B)項で得られた目的の組換えプラスミドの挿入断片の塩基配列の決定は、例えば以下のように行われる。まず、挿入断片を該断片の内部に存在する制限酵素部位を用いて切断し、それぞれのcDNA断片を各々適当なシーケンスベクター、例えば、BlueScript中にサブクローニングする。次にクローニングした断片の塩基配列を、例えば自動DNAシーケンサーを用いて、ダイプライマーサイクルシーケンシング法あるいはダイデオキシサイクルシーケンシング法によって、決定する。これにより、断片全体の塩基配列が決定される。

50 【0084】 (4) アドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、プロアドレノメデュリンN末端20ペプチド (proAM-N20)、抗体作成用のそれらの断片、およびプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチド (proAM-N(10-20)) の作製

本発明のアドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20、抗体作成用のそれらの断片、およびproAM-N(10-20)は、種々の方法で作成され得る。それらの方法には、組み換え法および化学合成法の使用が包含され

る。この組み換え法を使用する場合、アドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20、それらの断片、およびproAM-N(10-20)をコードするDNA配列は、種々の組み換え系を用いて発現される。発現ベクターの構築および適切なDNA配列を有する形質転換体の作成は、当該技術分野で公知の方法によって実施される。発現は、原核生物系または真核生物系で実施され得る。

【0085】原核生物宿主としては、E. coli、バチルス属菌、およびその他のバクテリアが用いられる。そのような原核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、E. coliは、典型的には、E. coli由来のプラスミドである、pBR322の誘導体を用いて形質転換される。ここでの制御配列とは、転写開始のためのプロモーター、必要に応じてオペレーター、およびリボソーム結合部位配列を含むと定義される。この制御配列には、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系 (Changら、Nature (1977) 198, 1056)、トリプトファンプロモーター系 (Goedelら、Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057)、および λ 由来のP_LプロモーターおよびN遺伝子リボソーム結合部位 (Shimatake、Nature (1981) 292:128) のような一般的に用いられているプロモーターが包含される。

【0086】真核生物宿主としては、例えば酵母が用いられる。このような真核生物には、複製部位と宿主に適合する制御配列とを含むプラスミドベクターが用いられる。例えば、酵母は、pYEUra3 (Clontech) を用いて形質転換される。その他に、酵母宿主で有用なプロモーターのクラスには、例えば糖分解酵素を合成するためのプロモーターが包含される。それには、3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター (Hitzemanら、J. Biol. Chem. (1980) 255:2073) が含まれる。他のプロモーターには、エノラーゼ遺伝子由来のもの、またはYE p13から得られたLeu2遺伝子由来のものが包含される。

【0087】適切な哺乳類プロモーターには、メタロチオネイン、SV40由来の初期または後期プロモーター、またはポリオーマウイルス、アデノウイルスII、ウシ乳頭腫ウイルスまたはトリ肉腫ウイルス由来のプロモーターのような他のウイルスプロモーターが包含される。

【0088】発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによって形質転換体を得られる。この形質転換体を適当な条件で培養することにより、所望のアドレノメデュリン、その前駆体、proAM-N20、それらの断片、またはproAM-N(10-20)などのペプチドが得られる。

【0089】C末端がアミド化されているペプチドを得るためには、宿主内で発現させて得られたペプチドのC末端のカルボキシル基を、化学的にアミド化するか、または目的のペプチドのC末端にGlyが付加したペプチドを調製し、これに前述のC末端アミド化酵素を作用させてアミド化すればよい。

【0090】上記アドレノメデュリンなどのペプチドの化学合成法は、当該技術分野で公知の方法で行われ得る。例えば、ペプチド合成機による固相法で合成され得る。C末端がアミド化されているペプチドは、ベンズヒドリルアミンレジンを用いて、ペプチド合成機にてC末端アミノ酸から順次N末端アミノ酸まで標準的なDCC/HOBtで縮合させ、得られたペプチドレジンから標準的なクリベージ法 (トリフルオロメタンスルホン酸法) で、目的とするペプチドを切り出して、作成し得る。

【0091】ジスルフィド結合は、例えば、空気酸化または適当な酸化剤でペプチドを酸化することにより形成させ得る。ジスルフィド結合の-CH₂-CH₂-結合への置換は、周知の方法 (O. Kellerら、Helv. Chim. Acta (1974) 57:1253) により行い得る。一般に、ジスルフィド結合の-CH₂-CH₂-結合に置換することにより、ジスルフィド結合の開裂がなくなり、タンパク質が安定化する。

【0092】(5) アドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、プロアドレノメデュリンN末端20ペプチド (proAM-N20)、抗体作成用のそれらの断片、およびプロアドレノメデュリンN末端10-20ペプチド (proAM-N(10-20)) の標識化

本発明のアドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20、抗体作成用のそれらの断片、およびproAM-N(10-20)は、放射性同位元素、酵素、蛍光物質などで標識化され得る。これらの標識化は、いずれも当該技術分野で公知の方法で実施され得る。

【0093】標識に用いられる放射性同位体は、¹⁴C、³H、³²P、¹²⁵I、¹³¹Iなどであり、特に¹²⁵Iが好適に用いられ得る。これらは、クロラミンT法、ペルオキシダーゼ法、Iodogen法、ボルトンハンター法などにより、ペプチドに標識され得る。標識に用いられる酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ウシ粘膜アルカリホスファターゼ、大腸菌 β -ガラクトシダーゼなどがある。

【0094】標識に用いられる蛍光物質としては、フルオレサミン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどがある。

【0095】標識されたペプチドは、トレーサーとして、あるいは以下に述べる免疫学的測定法に有用である。

【0096】(6) アドレノメデュリン、その断片、およびproAM-N20の免疫学的測定法

本発明の免疫学的測定法は、試料中の抗原の量を測定するのに利用され得る。免疫学的測定法には、例えば、放射性同位元素、酵素、または蛍光物質で標識した抗原と標識していない抗原とを抗体に対して競合的に反応させる方法；抗原を固相 (例えば、マイクロプレートまたはプラスチック製カップ) に固定し、抗血清の希釈物または精製抗体と共にインキュベートし、さらに放射性同位

元素、酵素、または蛍光物質で標識した抗免疫グロブリンとともにインキュベートして、標識した結合物を得る二抗体法；および抗体を固相に固定し、抗原と共にインキュベートし、さらに放射性同位元素、酵素、または蛍光物質で標識した抗体と共にインキュベートして、標識した結合物を得るサンドイッチ法が含まれる。標識に用いられ得る放射性同位元素としては、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I などが挙げられ、特に ^{125}I が好適に用いられ得る。標識に用いられ得る酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ウシ粘膜アルカリホスファターゼ、大腸菌 β -ガラクトシダーゼなどがあり、好適には西洋ワサビペルオキシダーゼが用いられ得る。標識に用いられる蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどがある。しかし、これらに限定されるものではない。

【0097】具体的にはまず、アドレノメデュリン、proAM-N20、あるいはそれらの断片のペプチド、例えば、配列表の配列番号1の3位のGlnから12位のArgまで、配列表の配列番号1の1位のTyrから12位のArgまで、配列表の配列番号1の47位のIleから52位のTyrまで、配列表の配列番号1の45位のSerから52位のTyrまで、あるいは配列表の配列番号1の40位のAsnから52位のTyrまでのアミノ酸配列のアミノ酸配列を含むペプチド、またはこれらのアミノ酸配列を含みかつアドレノメデュリンを認識する抗体を産生させ得るペプチド、配列表の配列番号1の-61位のTrpから-54位のArgまで、配列表の配列番号1の-65位のPheから-54位のArgまでのアミノ酸配列を含むペプチド、またはこれらのアミノ酸配列を含みかつproAM-N20を認識する抗体を産生させるペプチド、あるいはこれらをウシ甲状腺グロブリンなどと結合させたものを免疫原とし、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、あるいはヤギのような動物を免疫して、その血清由来の抗体を作成する。あるいはその動物の脾臓から細胞を取り出し、ミエローマ細胞などのような細胞と融合させてハイブリドーマを作成した後、該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を産生させる。

【0098】次に、免疫に用いた免疫原と同一の抗原を有する標識した一定量のペプチドに、濃度既知の非標識抗原、および血清由来のポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を加えて、抗原抗体競合反応を行わせる。非標識抗原の濃度を適当に変化させた後、抗体に結合した標識抗原と抗体に結合していない標識抗原とを適当な方法で分離して、抗体と結合した標識抗原の放射エネルギー、酵素活性、または蛍光強度を測定する。非標識抗原の量が増すにつれ、抗体と結合する標識抗原の量は減少する。この関係をグラフにして標準曲線を得る。

【0099】次に、上記の反応系に濃度既知の非標識抗原の代わりに未知量の抗原を含む試料を加え、これを反

応させた後に得られる放射エネルギー、酵素活性、または蛍光強度を、標準曲線にあてはめれば、試料中の抗原の量を知ることができる。

【0100】サンドイッチ法の場合、例えばまず、アドレノメデュリンの異なるエピトープに対する2種類の抗体を調製する。一方の抗体を放射性同位元素、酵素、または蛍光物質で標識する。他方の抗体は、固相に結合させて固相化抗体とするか、または固相と特異的に結合し得るようにする。これらの抗体と種々の濃度の抗原を反応させて、抗原抗体複合体を形成させる。この抗原抗体複合体は固相に結合するので、この固相を分離し、固相中の放射エネルギー、酵素活性、または蛍光強度を測定して、標準曲線を得る。

【0101】上記反応系に、未知量の抗原を含む試料を加え、これを反応させた後に得られる放射エネルギー、酵素活性、または蛍光強度を標準曲線にあてはめれば、試料中の抗原量を測定できる。

【0102】本発明の測定法に用いる抗体は、通常の免疫測定法に用いられる抗体断片、例えばFabおよびFab'でもよい。

【0103】(7) proAM-N20のカテコルアミン分泌に対する作用の確認

本発明のproAM-N20のカテコルアミン分泌に対する作用は、例えば、以下のようにして確認できる。すなわち、培養ウシ副腎髄質細胞にproAM-N20を添加してインキュベートし、HPLCでカテコルアミンを測定して、無添加の対照と比較することにより確認できる。

【0104】(8) proAM-N(10-20)のNaチャンネルに対する作用の確認

本発明のproAM-N(10-20)のNaチャンネルに対する作用は、例えば、以下のようにして確認できる。すなわち、培養ウシ副腎髄質細胞をproAM-N(10-20)で処理した後、カルバコール刺激による細胞内への ^{22}Na 流入を液体シンチレーションカウンターで測定して、未処理の対照と比較することにより確認できる。

【0105】(9) アドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20およびproAM-N(10-20)の用途と投与

本発明のアドレノメデュリンおよびその前駆体タンパク質は、血圧降下作用ならびに血管拡張作用を有するため、高血圧や心不全のような疾患の治療に有用である。

【0106】本発明のproAM-N20は、カテコルアミン分泌抑制作用を有するため、高血圧の治療などのカテコルアミン抑制剤として有用である。

【0107】本発明のproAM-N(10-20)は、Naチャンネル抑制作用を有するため、高血圧の治療などのNaチャンネル抑制剤として有用である。

【0108】本発明のアドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20およびproAM-N(10-20)は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing

社、Eston、Paに記載されているような従来のペプチドの処方物の形で投与され得る。好ましくは、これらのペプチドは、注射によって、より好ましくは、静脈注射によって、投与され得る。投与量のレベルは、被検体の体重1kg当り、アドレノメデュリンでは約0.1nmol~3.0nmolである。

【0109】本発明のアドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20およびproAM-N(10-20)は、特に心筋梗塞などの急性期に心不全の改善のため、心臓の負荷をとるために静注もしくは点滴用の薬剤として用いられ得る。

【0110】本発明のアドレノメデュリン、その前駆体タンパク質、proAM-N20およびproAM-N(10-20)のC末端にGlyが付加したペプチドは、前述の通り、生体内のC末端アミド化酵素がGlyに作用して、生体内でC末端のカルボキシ基がアミド化された形のペプチドになるので、そのまま投与してもよい。

【0111】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

【0112】〔実施例1〕

(アドレノメデュリンのヒト褐色細胞腫からの精製) アドレノメデュリンの精製は、ノルエビネフリン優性褐色細胞腫患者から手術により切除した褐色細胞腫を用いて、Kitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 185, 134-141 (1992)に記載のようにして行った。

【0113】具体的には、まず、取り出した褐色細胞腫を細かく刻み、4倍量の1M酢酸中で10分間煮沸して、内在性のプロテアーゼを不活性化させた。この混合物を冷却した後、4℃にてポリトロンミキサー中でホモジナイズした。ホモジナイズした後の懸濁液を、20,000×gで30分間遠心分離して得られた上清を、66%でアセトン沈澱させた。沈澱物を取り除いた後、上清をロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮液を水で2倍にし、C-18シリカゲルカラム(270ml, Chemco LS-SORB ODS)にかけた。カラムに吸着した物質を、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む、60%CH₃CNで溶出した。溶出液をエバポレートし、1M酢酸で平衡化させたSP-セファデックスC-25カラム(H⁺型、2×15cm、ファルマシア)にかけた。1M酢酸、2Mピリジン、および2Mピリジン-酢酸(pH 5.0)による連続的な溶出によって、それぞれSP-I、SP-II、およびSP-IIIと呼ばれる3つの画分が得られた。

【0114】90%以上の血小板cAMP上昇活性を含むSP-III画分をセファデックスG-50ゲル濾過によって分離した。この時の活性測定法については、Kitamuraら、前述、に記載の通りである。すなわち、135mM NaCl、2mM EDTA、5mM グルコース、10mM テオフィリン、15mM ヘペス(pH 7.5)を含む懸濁培地に溶解した試料の25μlを、37℃で10分間予めインキュベートした。25μlの洗

浄ラット血小板(4.0×10⁵)を加えて反応を開始し、30分間インキュベートした。150mM HClを加えて3分間加熱して反応を停止した。試料を減圧濃縮機(speedvac concentrator)で濃縮し、100μlの50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.2)に溶解した。溶液中のサイクリックAMPをスクシニル化し、cAMP RIAにより分析した。

【0115】上記の活性を示す画分(分子量4,000~6,000)を、TSK CM-2SWカラム(8.0×300mm, Tosoh)でのCMイオン交換HPLCにより、さらに分離した。アドレノメデュリンは、フェニールカラム(4.6×250mm, Vydac)およびμBondasphere C-18カラム(4.6×150mm, 300Å, Waters)を使用した逆相HPLCにより、最終的に精製した。

【0116】(アドレノメデュリンの構造分析) 200 pmolの精製アドレノメデュリンを、Kangawaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 131-139 (1984)に記載されている方法に従って、還元およびS-カルボキシメチル化(RCM)した。得られたRCM-アドレノメデュリンを、逆相HPLCで精製した。精製RCM-アドレノメデュリンの半分(100 pmol)を気相配列分析機(Model, 470A/120A, Applied Biosystems)にかけた。アドレノメデュリンの残りの半分の、0.01%トリトン-X 100を含む50 mM Tris-HCl(pH 8.0)の50μl中、37℃で3時間、400 ngのアルギニルエンドペプチダーゼ(Takara Shuzo, Kyoto, Japan)により消化して、ペプチドフラグメントRE1~6を作成した。これらのペプチドフラグメントを、Chemcosorb 3 ODS H(2.1×75 mm, Chemco, Osaka, Japan)のセミマイクロカラムでの逆相HPLCにより分離し、各フラグメントを気相アミノ酸配列分析機(Model 470A/120A, Applied Biosystems)で配列分析し、最終的にアドレノメデュリンの全アミノ酸配列(図1)を決定した。52アミノ酸からなるアドレノメデュリンは、1個の分子内ジスルフィド結合を有する。カルボキシ末端のTyrは、アミド化されていた。これは、天然アドレノメデュリンの[45-52](RE6)部分が、逆相HPLCで、合成アドレノメデュリンの[45-52]NH₂部分と同じ位置に溶出されることから判った。このようにしてアドレノメデュリンの構造は、天然アドレノメデュリンおよび決定された配列に対応して調製した合成ペプチドとクロマトグラムを比較して実証した。コンピューターサーチ(PRF-SEQDB, Protein Research Foundation, Osaka, Japan)では、同じペプチド配列は報告されていないことが示された。従って、アドレノメデュリンは、生理活性を有する新規ペプチドであることが確認された。図2に示すように、アドレノメデュリン(AM)と、ヒトCGRP(Morrisら、Nature, 308, 746-748 (1984))、CGRP II(Steenberghら、FEBS Lett., 183, 403-407 (1985))およびアミリン(amy)(Cooperら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 8628-8632 (1987))との配列相同性に関していえば、分子内ジスルフィド結合による6残基環状構造ならびにC末端ア

ミド構造は共通しているが、約20%と低い。アドレノメデュリン中の14残基アミノ末端伸長は、CGRPおよびアミリンにおいては認められない。

【0117】〔実施例2〕

(アドレノメデュリンの血圧降下作用) アドレノメデュリンの血圧降下作用は、ラット脳性ナトリウム利尿ポリペプチド (BNP) について報告されているのと同様の方法 (Kitaら、Eur. J. Pharmacol., 202, 73-79 (1991)) により試験した。2週齢の雄Wistarラット (300g) に、腹腔内にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を注射して麻酔をかけた。Statham 血圧変換機 (pressure transducer) (P231 D型、Gould) に接続された右頸動脈カテーテル (PE-50) から継続的に血圧をモニターした。PE-10カテーテルを、保持溶液とペプチドの両方を投与するために、右頸静脈に挿入した。少なくとも60分間平衡化した後、CGRPあるいはアドレノメデュリンのいずれかを静脈内注射した。CGRPあるいはアドレノメデュリンを投与したときの麻酔ラットの血圧の変動を、図3に示す。図3の1、2、および3は、アドレノメデュリンを、それぞれ0.3nmol/kg、1.0nmol/kg、および3.0nmol/kg投与した時の血圧の変動を示し、4は、CGRPを3.0nmol/kg投与した時の血圧の変動を示す。この時投与したアドレノメデュリンは、配列表の配列番号1の1位から52位までのペプチドであって、C末端がアミド化されている。

【0118】アドレノメデュリンの静脈内単回注射で、投与量依存的に、迅速で強力な、かつ長時間持続性の血圧降下作用が生じた。アドレノメデュリン3.0 nmol/kgを静脈内に注射したときには、平均血圧の最大減少は、 53 ± 5.0 mmHg (平均値 \pm S.E.M., $n=4$) であった。この有意な血圧降下作用は30~60分間持続した。図3の3および4から明らかなように、アドレノメデュリンの血圧降下活性は、強力な脈管弛緩因子の1つであることが報告されているCGRPと同等である。従って、アドレノメデュリンは、有効な長時間持続性の血圧降下作用を有するといえる。

【0119】配列表の配列番号1の13位から52位までのアミノ酸配列であって、C末端がアミド化されているアドレノメデュリンを投与して、同様に血圧の変動を調べることにした。

【0120】まず、ペプチド[13-52] NH_2 を、ペンズヒドリルアミンレジンを用いて、ペプチド合成機 (Applied Biosystems, 430A) にて、C末端アミノ酸 (52番目のTyr) から、順次13位のN末端アミノ酸まで、標準的なDCC/HOBtで縮合させて、目的とするペプチドを合成した。得られたペプチドレジンから、標準的なクリベージ法 (トリフルオロメタンスルホン酸法) で、目的とするペプチドを切り出し、必要に応じて、空気酸化または適当な酸化剤 (フェリシアン化カリ、ヨードなど) で酸化してジスルフィド結合を形成させ、逆相HPLCで精製し

た。

【0121】このペプチドを上記の1位から52位のアドレノメデュリンと同様に投与したところ、同等の血圧降下作用があった。

【0122】(アドレノメデュリン投与時の心拍数の確認) 体重330~390gの雄のWistarラットを、Charles River Inc. から購入した。ラットを、腹腔内注射により、ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) で麻酔した。呼吸を補助するために、気管にポリエチレンカテーテル (PE-250) を挿入した。平均血圧 (MBP) および心拍数 (HR) を、Statham圧力トランスデューサー (モデルP231D、Gould社製) およびポリグラフ (モデル141-6、San-Ei社製) に接続した右大腿部動脈カテーテル (PE-50) でモニターした。PE10のカテーテルを右頸静脈から右心房へPE-10カテーテルを挿入した。右頸動脈を通して上行大動脈へサーモセンサーをおいた。心アウトプットを、サーモダイリレーション法 (モデル600、Cardiotherm社製) によって測定した。動脈の温度を $36^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ に保つために、ラットをヒートテーブル上に置いた。

【0123】ラットを手術後45分間安定させ、次に、生理食塩水に溶かしたヒトアドレノメデュリン (1.0nmol/kg) ($n=8$) あるいは同じ量の等張生理食塩水 ($n=8$) を、頸静脈的に注射した。予備試験では、この量のアドレノメデュリンの血管抑制反応は、最大効力の約半分であった。心アウトプットは投与の15分前、投与時、ならびに投与後2、5、10、および30分後に測定した。

【0124】心インデックス (CI)、拍出量 (SVI)、および総末梢抵抗インデックス (TPRI) は、以下の式から計算した。 $\text{CI} (100\text{g体重当りml/分}) = \text{心アウトプット} / 100\text{g体重}$ 、 $\text{SVI} (100\text{g体重当り}\mu\text{l/ビート}) = \text{CI} / \text{HR}$ 、 $\text{TPRI} (\text{u} \cdot 100\text{g体重}) = \text{MBP} / \text{CI}$ 。

【0125】ヒトアドレノメデュリンあるいはペプチドは、固相法によって合成し、その均一性を逆相HPLCで確かめた。すべての結果を平均値 \pm S.E.M. で表した。

【0126】図4に、ラットに生理食塩水に溶かしたヒトアドレノメデュリン (黒丸) あるいは生理食塩水 (白丸) を投与したときのMBP、HR、CI、SVIおよびTPRIの経時変化を示す。

【0127】MBPは、ヒトアドレノメデュリン投与の2、5、および10分後に有意に減少し、30分後にもとのレベルにもどった。TPRIは、MBPの減少に伴う形で、2、5、および10分後に有意に減少した。これとは逆に、CIおよびSVIは、増加した。投与後2分でHRの減少傾向が少しみられたが、有意な差は認められなかった。一方、生理食塩水を投与したラットでのこれらのCI、SVI、TPRI、MBP、およびHRは、変化しなかった。

【0128】〔実施例3〕

(アドレノメデュリンおよびその断片を用いたRIA法)

(A) アドレノメデュリンのN末端側のアミノ酸配列で

なるペプチド断片に対する抗体を用いたRIA

配列表の配列番号1の1位から12位までに対応するペプチド[1-12]および配列表の配列番号1の3位から12位までに対応するペプチド[3-12]を、ペプチド合成機 (Applied Biosystems, 430A) による固相法によって合成し、逆相HPLCで精製した。

【0129】ペプチド[1-12]10 mgおよびウシ甲状腺グロブリン20 mgを、2 mlの0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中でグルタルアルデヒドを作用させて結合した (Miyataら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 1030-1036 (1984))。反応混合物を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) / 0.08 M NaClに対して透析し、文献の記載 (Miyataら、前記) に従って免疫用を使用した。免疫は、ニュージーランドシロウサギを使って行った。免疫された動物から得られた抗血清を、以下のRIA法に使用した。

【0130】ペプチド[1-12]およびペプチド[3-12]に対するRIAを、 β -ネオ-エンドルフィンについて報告されているKitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 966-974 (1982)と同様の方法により行った。

【0131】すなわち、既知の濃度のペプチド[1-12]あるいは[3-12]100 μ l、1:6,000希釈の上記のようにして得られた抗血清50 μ l、および、ラクトペルオキシダーゼ法 (Kitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 348-352 (1989)) により調製した 125 I標識リガンド (18,000 cpm) 50 μ lからなるRIAの反応混合物を、24時間インキュベーションした後、抗血清に結合されていない標識リガンドと、抗血清に結合された標識リガンドとを、ポリエチレングリコール法により分離した。ペレットの放射活性を γ カウンター (ARC-600, Aloka) によりカウントし、測定は4°Cで2回行った。このようにして得られた値から標準曲線を求めたところ、ペプチド[1-12]を用いた場合もペプチド[3-12]を用いた場合も同じ曲線が得られることがわかった。アドレノメデュリン[1-12]および[3-12]による放射ヨード化リガンド結合の最大阻害の1/2値は、10 fmol/tubeに認められた。

【0132】次に、アドレノメデュリンを未知量含む試料溶液をウシ血清アルブミン (BSA) 20 μ gを含む100 μ lの0.1M NH_4HCO_3 中で、1 μ gのトリプシン (Worthington) でトリプシン処理に供した。この試料溶液100 μ l、1:6,000希釈の抗血清50 μ l、および、ラクトペルオキシダーゼ法 (Kitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 348-352 (1989)) により調製した 125 I標識リガンド (18,000 cpm) 50 μ lからなる反応混合物を、24時間インキュベーションした後、抗血清に結合されていない標識リガンドと、結合された標識リガンドとを、ポリエチレングリコール法により分離した。ペレットの放射活性を γ カウンター (ARC-600, Aloka) によりカウントし、測定は4°Cで2回行った。

【0133】RIA法によって、上記抗血清が、トリプシ

ン消化後のアドレノメデュリンの断片のペプチドを認識することがわかった。従って、ペプチド[1-12]およびペプチド[3-12]は、アドレノメデュリンに対する抗体の産生に有用であることがわかった。

【0134】(B) アドレノメデュリンのC末端側のアミノ酸配列でなるペプチド断片に対する抗体を用いたRIA法

配列表の配列番号1の1位から52位までに対応するペプチド[1-52] NH_2 、13位から52位までに対応する[13-52] NH_2 、40位から52位までに対応するペプチド[40-52] NH_2 、45位から52位までに対応するペプチド[45-52] NH_2 、ペプチド[45-52]、47位から52位までに対応するペプチド[47-52] NH_2 およびペプチド[47-52]、および1位から12位までに対応するペプチド[1-12]を、ペプチド合成機 (Applied Biosystems, 430A) による固相法によって合成し、逆相HPLCで精製した。このうち、特にC末端がアミド化しているペプチドの合成は、ベンズヒドリルアミンレジンをを用いて、ペプチド合成機にてC末端アミノ酸 (52番目のTyr) から順次40位、45位、47位または1位のN末端アミノ酸まで、標準的なDCC/HOBtで縮合させて行った。得られたペプチドレジンから、標準的なクリベージ法 (トリフルオロメタンスルホン酸法) により、目的とするペプチドを切り出した。

【0135】ジスルフィド結合の形成は、前記と同様にして行った。

【0136】ペプチド[40-52] NH_2 9.3 mgおよびウシ甲状腺グロブリン10.3 mgを、0.5mlの生理食塩水中に溶解させた。この溶液に水溶性カルボジイミドを、2時間おきに、室温で攪拌しながら50mgずつ5回加えた。この結果得られた混合物を、続いて4°Cにて一晩攪拌した。この反応混合物を、500mlの生理食塩水に対して5回、500mlのリン酸ナトリウム緩衝液に対して2回透析した。このようにして得られた透析物を、上記緩衝液を加えて、最終体積11mlとなるように調整した。

【0137】この抗原結合溶液 (1.5~3ml) を、等量のフロイントの完全アジュバントで乳化させた。これを用いて、ニュージーランドシロウサギを免疫し、免疫された動物から得られた抗血清を、以下のRIA法に使用した。

【0138】ペプチド[1-52] NH_2 、ペプチド[40-52] NH_2 、ペプチド[45-52] NH_2 、ペプチド[45-52]、ペプチド[47-52] NH_2 、ペプチド[47-52]、ペプチド[1-12]、CGRP、CGRP-II、およびアミリンに対するRIAを、 β -ネオ-エンドルフィンについて報告されているKitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 966-974 (1982)と同様の方法により行った。

【0139】すなわち、既知の濃度のペプチド100 μ l、1:180,000希釈の上記のようにして得られた抗血清50 μ l、および、ボルトンハンター法 (A. E. Boltonおよび

W. M. Hunter, Biochemical J. (1973) 133, 529-539) により調製した¹²⁵I標識リガンド (18,000 cpm) 50 μ l かなるRIAの反応混合物を、24時間インキュベーションした後、抗血清に結合されていない標識リガンドと、結合された標識リガンドとを、ポリエチレングリコール法により分離した。ペレットの放射活性を γ カウンター (ARC-600, Aloka) によりカウントし、測定は4℃で2回行った。このようにして得られた値から標準曲線求めた。ペプチド[1-52]NH₂の、ペプチド[13-52]NH₂、ペプチド[40-52]NH₂、ペプチド[45-52]NH₂、およびペプチド[47-52]NH₂に対する放射ヨード化リガンド結合の最大阻害の1/2値は、11fmol/tubeに認められた。

【0140】RIA法によって、上記抗血清は、抗原であるペプチド[40-52]NH₂と反応性があり、さらに、ペプチド[1-52]NH₂、ペプチド[45-52]NH₂、ペプチド[47-52]NH₂に対して交叉反応性を有すること、ならびにペプチド[45-52]、ペプチド[47-52]、ペプチド[1-12]、CGRP、CGRP-II、およびアミリンに対しては交叉反応性を有しないことがわかった。

【0141】(アドレノメデュリンの各組織での分布) ヒトの褐色細胞腫、副腎髄質、肺、腎臓、脳皮質、腸、および心室を、1.0gずつとり、それぞれ5倍容量のH₂O中で10分間煮沸して、内在性のプロテアーゼを不活性化した。冷却後、氷酢酸を1Mになるように加え、混合物をポリトロンミキサーを用いて4℃でホモジナイズした。24,000×gで30分間遠心分離して得た抽出物の上清を、予め1M酢酸で平衡化しておいたSep-Pak C-18カートリッジ (Waters) にかけて、吸着された物質を、0.1%トリフルオロ酢酸中60%アセトニトリル3mlで溶出した。溶液中のアドレノメデュリンを、Ichikiら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 1587-1593 (1992)に記載の条件下で、TSK ODS 120A (4.6×150 mm, Tosoh) カラムを使用した逆相HPLCにより分析した。

【0142】逆相HPLCによるペプチドの同定を組み合わせたRIAを使用して、アドレノメデュリンの存在を、上記ヒト組織において調べた。その結果を表1に示す。

【0143】

【表1】

組 織	免疫反応性アドレノメデュリン (fmol/ng 湿重量)		
褐色細胞腫	1,900	±	450
副腎髄質	150	±	24
肺	1.2	±	0.16
腎臓	0.15	±	0.012
脳皮質		<	0.1
腸		<	0.1
心室		<	0.1

【0144】ヒト褐色腫組織は、アドレノメデュリンを多量に非常に富み、1,900±450 fmol/mg湿重量含んでいた。アドレノメデュリンはまた、正常副腎髄質中にも多量に存在し、150±24 fmol/mgであった。アドレノメデュリンの、肺および腎臓中の濃度は、正常副腎髄質中の濃度の1%以下であった。しかし、アドレノメデュリンの肺および腎臓中の総量は、副腎髄質中の総量よりも多い。CGRPは、神経ペプチドとして機能し、脳中および末梢神経に存在するが、アドレノメデュリンは脳中に検出されなかった。さらに、予備実験で、アドレノメデュリンは健全なヒト血漿中に相当な濃度 (19±5.4 fmol/ml, n=4) で存在することが示された。従って、末梢組織、副腎髄質、肺および腎臓で産生されたアドレノメデュリンは、血圧制御に関与する循環ホルモンとして機能する。ヒト褐色細胞腫中で促進されたアドレノメデュリンの産生は、起立性血圧低下症などの、褐色細胞腫患者の種々の症候に関連するようである。

【0145】【実施例4】

(ブタ副腎髄質からのアドレノメデュリンの精製および構造解析)

(A) ブタ副腎髄質からのアドレノメデュリンの精製
ブタ副腎髄質から、上記実施例1のヒトアドレノメデュリンの精製法と同様の方法によって、ブタアドレノメデュリンを精製した。

【0146】具体的には、まず、取り出したブタ副腎髄質を細かく刻み、10倍量の1M酢酸中で10分間煮沸して、内在性のプロテアーゼを不活性化させた。この混合物を冷却した後、4℃にてポリトロンミキサー中でホモジナイズした。ホモジナイズした後の懸濁液を、22,000×gで30分間遠心分離して得られた上清を、Sep-Pak C-18カートリッジカラム (20ml, Waters) にかけて。カラムに吸着した物質を、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む、60%CH₃CNで溶出した。溶出液をエバポレートし、この液を粗ペプチド抽出物として、さらに以下に示すように、実施例3に記載のRIA法を用いて精製を進めていった。このRIA法は、すでに実施例3で述べたよ

うに、ヒトアドレノメデュリン由来のペプチド[I-12]を用いたRIAシステムとして確立されている。

【0147】まず、粗ペプチド抽出物を、ゲル濾過クロマトグラフ法(セファデックス G-50, Fine, 3×150 cm)により分離した。1つの主要な免疫反応性(ir)-アドレノメデュリンが、分子量5,000~6,000に観察された。この分画のペプチドは、さらにTSK CM-2SW (8.0×300mm, Tosoh) カラムを用いたCMイオン交換HPLCにより分離した。1つの主要なir-アドレノメデュリンが、ヒトアドレノメデュリンと同じ位置に観察された。これを、さらにphenyl (4.6×250mm, Vydac) カラムを用いた逆相HPLCにより最終的に精製した。210nmの吸収およびir-アドレノメデュリンの溶出プロフィールは、ヒトアドレノメデュリンと正確に一致していた。

【0148】(B) ブタアドレノメデュリンの構造分析
上記A項で得られたブタアドレノメデュリン100 pmolを、Kangawaら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 118, 131-139 (1984)に記載されている方法に従って、還元およびS-カルボキシメチル化(RCM)した。得られたRCM-アドレノメデュリンを、逆相HPLCで精製した。精製RCM-アドレノメデュリンを気相配列分析機(Model, 470A/120A, Applied Biosystems)にかけ、アミノ酸配列を37番目の残基まで決定した。これとは別に、ブタアドレノメデュリン各100 pmolを、0.01%トリトンを含む0.1MNH₄HCO₃中、37℃で500ngのトリプシンおよびキモトリプシンそれぞれにより限定分解して、ペプチドフラグメントを作成した。このペプチドフラグメントを、Chemcosorb 3 ODS H (2.1×75 mm, Chemco, Osaka, Japan)のセミマイクロカラムでの逆相HPLCにより分離し、各フラグメントを気相配列分析機(Model 470A/120A, Applied Biosystems)で配列分析し、最終的にブタアドレノメデュリンの全アミノ酸配列を決定した。52アミノ酸からなるアドレノメデュリンは、1個の分子内ジスルフィド結合を有する。カルボキシ末端のTyrは、アミド化されていた。

【0149】ヒトアドレノメデュリンの40位のアスパラギンが、グリシンに代わっていたこと以外は、ブタアドレノメデュリンのアミノ酸配列は、ヒトアドレノメデュリンのアミノ酸配列と同一であった。

【0150】(ブタ由来のアドレノメデュリンcDNAのクローニング)

(A) プライマーの合成

上記のようにして得られたブタ由来のアドレノメデュリンのアミノ酸配列を基にして、DNAオリゴマーを合成し、これをプライマーとしてポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR, Saiki, R.K.ら、Science, 239, 487-494 (1988))によって、以下に示すcDNAライブラリーのスクリーニングに使用するためのプローブを作成した。

【0151】このPCRに用いるDNAオリゴマーの設計、お

よびその作成は、以下の通りである。各アミノ酸残基に対応するコドン considering して、決定したアミノ酸配列の、ある領域をコードしうるDNA配列のすべてを網羅する混合DNAオリゴマーを設計することができる。実際には、哺乳動物で優先的に使用されるコドンを主に用い、決定されたアミノ酸の3位から8位および35位から41位の配列を基に、それぞれオリゴマー(I)(配列表の配列番号3)およびオリゴマー(II)(配列表の配列番号4)、ならびにオリゴマー(III)(配列表の配列番号5)のDNAオリゴマーを合成した。これらのうちオリゴマー(III)は、アドレノメデュリンをコードしている遺伝子の相補鎖の塩基配列に基づくものである。これらのDNAオリゴマーは、短鎖であるため核酸合成機(Pharmacia LKB Gene Assembler Plus, DNASynthesizer)を用いて化学合成した。

【0152】(B) PCRに用いる鋳型試料の調製
ヒトアドレノメデュリンの各組織を調べた結果から、副腎髄質に高濃度のアドレノメデュリンが存在していることがわかったので、遺伝子クローニングの材料として副腎髄質が適したものであると考えられる。

【0153】ブタ副腎髄質より、グアニジウムチオシアネートを用いた方法(Chomczynski, P.ら、Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987))によってRNAを抽出した。オリゴ(dT)セルロースカラム(ファルマシア)を用いてポリ(A)⁺RNAを単離した。5 μgのブタ副腎髄質ポリ(A)⁺RNAから、GublerおよびHoffmanの方法によって、二本鎖cDNAを作成した。この二本鎖cDNAにEcoRIアダプターを連結し、次にSephacryl S-300(ファルマシア)でサイズ分画して、目的のアドレノメデュリンが含まれていると予想される画分を得た。得られた画分をλgt10アーム(Bethesda Research Laboratory)にいれ、インビトロでパッケージングして、cDNAライブラリーを作成した。

【0154】(C) PCRによるブタアドレノメデュリンcDNAの増幅と単離

上記A項で得られたDNAオリゴマー(I)と(III)、あるいは(II)と(III)を用いて、上記B項で得られたcDNAライブラリーから、アドレノメデュリンcDNA断片の増幅を行った。PCRには、酵素として、米国Perkin Elmer Cetus社のAmpli-Taq DNAポリメラーゼを用い、反応液の組成は、当酵素の使用説明書に従った。増幅装置は、Perkin Elmer Cetus社のThermalサイクラーを使用し、94℃1分、37℃1分を15サイクル、引き続いて94℃50秒、48℃50秒、72℃1分を15サイクルで増幅を行った。

【0155】増幅したcDNAフラグメントを、ランダムプライム法で標識し、ブタ副腎髄質cDNAライブラリーをインサイチュブラークハイブリダイゼーション法でプロービングするのに用いた。

【0156】(D) ブタアドレノメデュリンのcDNA

の配列決定

ブランクハイブリダイゼーション法で得られた陽性のクローンをブランク精製し、cDNAを取り出して、組み換えBlueScriptプラスミドを得た。最長のcDNA挿入断片を含むクローンを配列決定に用いた。このクローンを適当な制限酵素 (SmaI、NaeI、およびRsaI) で切断したcDNAインサートを再度BlueScript中にサブクローニングし、そして、自動DNAシーケンサー (373A, Applied Biosystems) を用いて、ダイプライマーサイクルシーケンシング法によって、配列決定を行った。

【0157】 こうして得られたアドレノメデュリンcDNAの全長の配列を配列表の配列番号2に、そのアミノ酸配列と共に示す。

【0158】 [実施例5]

(ヒトアドレノメデュリンcDNAのクローニング) 上記実施例4のC項で得られたブタアドレノメデュリンcDNAフラグメントを用いて、実施例4と同様の方法によって、ヒトアドレノメデュリンcDNAのクローニングを行った。

【0159】 (A) cDNAライブラリーの調製
まず、ヒト褐色細胞腫より、グアニジウムチオシアネート法 (Chomczynski, P.ら, Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987)) によってRNAを抽出した。オリゴ (dT) セルロースカラム (ファルマシア) を用いてポリ (A) RNAを単離した。このポリ (A) RNAから、GublerおよびHoffmanの方法によって、二本鎖cDNAを作成した。この二本鎖cDNAにEcoRIアダプターを連結し、次にSephacryl S-300 (ファルマシア) でサイズ分画して、目的のアドレノメデュリンが含まれていると予想される画分を得た。得られた画分をλgt10アーム (Bethesda Research Laboratory) に入れ、インビトロでパッケージングして、cDNAライブラリーを作成した。

【0160】 (B) ヒトアドレノメデュリンのcDNA配列の決定

次に、ヒトアドレノメデュリンのcDNAの配列決定を以下のようにして行った。

【0161】 実施例4のC項で得られたブタアドレノメデュリンcDNAフラグメントをプローブとして、ブランクハイブリダイゼーション法によって、上記A項で得られたcDNAライブラリーをスクリーニングした。

【0162】 ブランクハイブリダイゼーション法で得られた陽性のクローンをブランク精製し、cDNAを取り出して、組み換えBlueScriptプラスミドを得た。最長のcDNA挿入断片を含むクローンを配列決定に用いた。このクローンを適当な制限酵素 (SmaI、NaeI、RsaI、およびSacI) で切断したcDNAインサートを再度BlueScript中にサブクローニングし、そして、自動DNAシーケンサー (373A, Applied Biosystems) を用いて、ダイプライマーサイクルシーケンシング法あるいはダイデオキシサイクルシーケンス法によって、配列決定を行っ

た。

【0163】 配列表の配列番号1に、このようにして得られたcDNA配列とそれに対応するアミノ酸を示す。

【0164】 [実施例6]

(proAM-N20の構造分析) proAM-N20は、上記実施例5により明らかになった配列表の配列番号1におけるプロアドレノメデュリンのアミノ酸配列のN末端部分に対応する部分であり、より詳細には配列表の配列番号1の-73位から-54位までに対応するペプチド[(-73)-(-54)]である。コンピューターサーチ (PRF-SEQDB, Protein Research Foundation, Osaka, Japan) では、同じペプチド配列の報告はなく、proAM-N20は生理活性を有する新規ペプチドであることが確認された。

【0165】 (proAM-N20のカテコルアミン分泌に対する影響) proAM-N20を、ペプチド合成機 (Applied Biosystems, 431A) による固相法によって合成し、逆相HPLCで精製した。

【0166】 (A) 培養ウシ副腎髄質細胞 (4日齢、 4×10^6 細胞/ディッシュ) をKrebs Ringer phosphate (KRP) 緩衝液にて洗浄した後、KRP緩衝液のみ、あるいはproAM-N20 (10^{-6} M) を添加したKRP緩衝液 1 ml 中で、37°Cで10分間インキュベートし、上清中のカテコルアミンの分泌量をHPLCにて測定した。

【0167】 カテコルアミン分泌量は、proAM-N20では $1.64 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ 細胞 ($n=2$)、対照では $2.56 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ 細胞であった。このように、カテコルアミンの分泌量はproAM-N20の添加により抑制された。

【0168】 (B) 次に、上記 (A) と同様に、proAM-N20 (10^{-6} M) を添加したKRP緩衝液 1 ml 中で、37°Cで5~10分間の前処置を行った後、カルバコール (10^{-6} M) を添加して刺激を加え、10分後のカテコルアミン分泌量を測定した。また、対照は、前処置を行わず、カルバコールの刺激のみによる10分後のカテコルアミン分泌量をHPLCにて測定した。

【0169】 カテコルアミン分泌量は、対照では $14.36 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ 細胞 ($n=2$) であったが、proAM-N20前処置5分間では $11.31 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ 細胞、10分間では $9.19 \mu\text{g}/4 \times 10^6$ 細胞であった。このように、proAM-N20で前処置することにより、カルバコール刺激によるカテコルアミン分泌は抑制された。

【0170】 [実施例7]

(proAM-N20およびその断片を用いたRIA法) 配列表の配列番号1の-73位から-54位までに対応するペプチド[(-73)-(-54)]NH₂、そのN末端にTyrを付加したペプチドN-Tyr-[-(73)-(-54)]NH₂、配列表の配列番号1の-65位から-54位までに対応するペプチド[(-65)-(-54)]NH₂、配列表の配列番号1の-61位から-54位までに対応するペプチド[(-61)-(-54)]NH₂、および配列表の配列番号1の-58位から-54位までに対応するペプチド[(-58)-(-54)]NH₂ を、フェノキシレジンを用い

て、ペプチド合成機 (Applied Biosystems, 431A) による固相法によって合成し、逆相HPLCで精製した。

【0171】ペプチド[(-73)-(-54)]NH₂ 10 mgおよびウシ甲状腺グロブリン20 mgを、カルボジイミド法 (Goodfriendら、Science, 144, 1344-1346 (1964)) により、結合した。この反応混合物を、1Lの生理食塩水に対して4回、50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) / 0.08 M NaClに対して2回透析した。この透析溶液を、等量のフロイントの完全アジュバントで乳化させ、これを用いて、雄のニュージーランドシロウサギを免疫した。免疫された動物から得られた抗血清を、以下のRIA法に使用した。ペプチドN-Tyr-[-(73)-(-54)]NH₂ は、ラクトペルオキシダーゼ法 (Kitamuraら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 348-352 (1989)) により標識した。¹²⁵I標識したペプチドは、TSK ODS 120Aカラム (Tosoh) を用いた逆相HPLCで精製し、トレーサーとして用いた。

【0172】既知の濃度のペプチド[(-73)-(-54)]NH₂ あるいは未知試料100 μl、および1:66,500希釈の上記のようにして得られた抗血清200 μlからなるRIAの反応混合物を、12時間インキュベーションした後、¹²⁵I標識リガンド (18,000 cpm) 100 μlを加えた。このRIAの反応混合物を、24時間インキュベーションした後、抗ウサギIgGヤギ血清100 μlを加えた。さらに24時間インキュベーションした後、2,000×gで30分間遠心分離し、ペレットの放射活性をγカウンター (ARC-600, Aloka) により測定した。測定は4℃で2回行った。このようにして得られた値から標準曲線を求めた。ペプチド[(-73)-(-54)]NH₂ による放射ヨード化リガンド結合の最大阻害の1/2値は、10 fmol/tubeに認められた。

【0173】RIA法によって、上記抗血清は、抗原であるペプチド[(-73)-(-54)]NH₂ と反応性があり、さらに、ペプチド[(-65)-(-54)]NH₂、およびペプチド[(-61)-(-54)]NH₂ に対して交叉反応性を有すること、ならびにペプチド[(-58)-(-54)]NH₂ に対しては交叉反応性を有さないことがわかった。従って、ペプチド[(-73)-(-54)]NH₂、ペプチド[(-65)-(-54)]NH₂、およびペプチド[(-61)-(-54)]NH₂ は、proAM-N20に対する抗体の産生に有用であることがわかった。

【0174】(proAM-N20の各組織での分布) ヒトの副腎髄質、褐色細胞腫、心臓 (右心房、左心房、右心室、左心室)、肺、腎臓、脾臓、小腸、肝臓、脾臓、および脳皮質を、1.0 gずつとり、それぞれ5倍容量のH₂O中で10分間煮沸して、内在性のプロテアーゼを不活性化した。冷却後、氷酢酸を1Mになるように加え、混合物をポリトロンミキサーを用いて4℃でホモジナイズした。24,000×gで30分間遠心分離して得た抽出物の上清を、予め1M酢酸で平衡化しておいたSep-Pak C-18カートリッジ (Waters) にかき、吸着された物質を、0.1%トリフルオロ酢酸中50%アセトニトリル4 mlで溶出した。溶液中の免疫反応性proAM-N20を、セファデックス G-50カラム (ファルマシア) を用いたゲル濾過、TSK ODS 120A (4.6×150 mm, Tosoh) カラムを使用した逆相HPLC、およびTSK CM-2SWカラムを用いたイオン交換HPLCにより分析した。

【0175】逆相HPLCによるペプチドの同定を組み合わせたRIAを使用して、proAM-N20の存在を、上記ヒト組織において調べた。その結果を表2に示す。

【0176】

【表2】

組 織	免疫反応性proAM-N20 (fmol/ng 湿重量)
副腎髄質	13.8 ± 7.93
褐色細胞腫	12.3 ± 9.82
心臓 右心房	5.72 ± 1.11
左心房	1.11 ± 0.62
右心室	< 0.1
左心室	< 0.1
肺	< 0.1
腎臓	< 0.1
脾臓	< 0.1
小腸	< 0.1
肝臓	< 0.1
脾臓	< 0.1
脳皮質	< 0.1

【0177】proAM-N20は、ヒト副腎髄質中に最も多量

に存在し、13.8±7.93 fmol/mg湿重量含んでいた。proA

M-N20はまた、心房にも多く存在していた。少量のproAM-N20は、心室、肺、腎臓、脾臓、小腸、肝臓、脾臓、および脳皮質で広く検出された。また、1mg湿重量当りのproAM-N20の量は、右心房は左心房の約5倍であった。しかし、心室には心房と比較して少量しか含まれていなかった。proAM-N20の分布は、アドレノメデュリンの分布と非常に似ていた。proAM-N20は、アドレノメデュリン前駆体中にアドレノメデュリンとともに含まれており、アドレノメデュリン、CGRP、BNP、心房に局在しているANPなどのように、循環系の調節に関連している可能性がある。

【0178】また、ヒト褐色腫組織のproAM-N20の濃度は、 12.3 ± 9.82 fmol/mg湿重量であった。しかし、各試料における値の変動が大きく、これは、proAM-N20を産生する腫瘍細胞の分化の程度によるものと考えられる。

【0179】【実施例8】

(proAM-N(10-20)のNaチャンネルに対する影響) proAM-N(10-20)は、上記実施例5により明らかになった配列表の配列番号1におけるプロアドレノメデュリンのアミノ酸配列のN末端付近に対応する部分であり、より詳細には配列表の配列番号1の-64位から-54位までに対応するペプチド[(-64)-(-54)]である。proAM-N(10-20)を、ペプチド合成機(Applied Biosystems, 431A)による固相法によって合成し、逆相HPLCで精製した。

【0180】培養ウシ副腎髄質細胞(4日齢、 4×10^6 細胞/ディッシュ)をKRP緩衝液にて洗浄した後、proAM-N(10-20)またはproAM-N20(各 10^{-6} M)を添加したKRP緩衝液1ml中で、37℃で5~10分間の前処理を行った後、カルバコール(300 μ M)を添加して刺激を加え、2分後の細胞内への 22 Na流入量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また、対照は、前処理を行わず、カルバコールの刺激のみによる2分後の細胞内への 22 Na流入量を測定した。

【0181】 22 Na流入量は、対照では99.8nmole/ディッシュ(n=2)であったが、proAM-N(10-20)では29.1nmole/ディッシュ(n=2)、proAM-N20では70.5nmole/ディッシュ(n=2)であった。このように、 22 Na流入量はproAM-N(10-20)の添加により約70%、proAM-N20の添加により約30%の抑制作用が認められた。

【0182】

【発明の効果】本発明によれば、このように、第一に、血圧降下作用を有する新規なペプチドである、アドレノ

配列

```
GGCACGAGCT GGATAGAACA GCTCAAGCCT TGCCACTTCG GGCTTCTCAC TGCAGCTGGG    60
CTTGGACTTC GGAGTTTTCG CATTGCCAGT GGGACGTCTG AGACTTTCTC CTTCAAGTAC    120
TTGGCAGATC ACTCTCTTAG CAGGGTCTGC GCTTCGCAGC CGGG ATG AAG CTG GTT    176
Met Lys Leu Val
```

```
TCC GTC GCC CTG ATG TAC CTG GGT TCG CTC GCC TTC CTA GGC GCT GAC    224
Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe Leu Gly Ala Asp
```

メデュリンおよび該アドレノメデュリンを含む血圧降下剤および血管拡張剤が提供され、さらに、カテコラミン分泌抑制作用を有する新規ペプチドであるproAM-N20および該proAM-N20を含むカテコラミン抑制剤が提供される。さらに、Naチャンネル抑制作用を有するproAM-N(10-20)および該proAM-N(10-20)を含むNaチャンネル抑制剤が提供される。これらの血圧降下剤、カテコラミン抑制剤およびNaチャンネル抑制剤は、心不全、心筋梗塞、高血圧などのような循環器疾患の治療に有用である。

【0183】本発明によれば、第二に、該アドレノメデュリンおよびその前駆体をコードするDNA配列、該DNA配列を有する発現ベクター、該発現ベクターを有する形質転換体、および該形質転換体を用いたアドレノメデュリンの製造方法が提供される。従って、血圧降下作用を有するアドレノメデュリンを、必要に応じて大量に安価に生産することが可能となる。

【0184】さらに、第三の効果として、該アドレノメデュリンおよび該proAM-N20に対する抗体、該抗体を用いた試料中のアドレノメデュリンおよびproAM-N20を定量するための方法、および該抗体の調製および該アッセイに有用なペプチドが提供される。これによって、試料がアドレノメデュリンおよびproAM-N20をどの程度含んでいるかを判断し、高血圧症をはじめとする循環器疾患の診断、予防、および治療に用いることができる。さらに、アドレノメデュリンおよびproAM-N20は、腫瘍マーカーとして用いられ得る。

【0185】

【配列表】

【0186】

【配列番号：1】

配列の長さ：1457

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：165...719

特徴を決定した方法：S

33		34
-90	-85	-80
ACC GCT CGG TTG GAT GTC GCG TCG GAG TTT CGA AAG AAG TGG AAT AAG		272
Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys		
	-70	-65
TGG GCT CTG AGT CGT GGG AAG AGG GAA CTG CGG ATG TCC AGC AGC TAC		320
Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr		
	-55	-50
CCC ACC GGG CTC GCT GAC GTG AAG GCC GGG CCT GCC CAG ACC CTT ATT		368
Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile		
	-40	-35
CGG CCC CAG GAC ATG AAG GGT GCC TCT CGA AGC CCC GAA GAC AGC AGT		416
Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro Glu Asp Ser Ser		
	-25	-20
CCG GAT GCC GCC CGC ATC CGA GTC AAG CGC TAC CGC CAG AGC ATG AAC		464
Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn		
	-10	-5
AAC TTC CAG GGC CTC CGG AGC TTT GGC TGC CGC TTC GGG ACG TGC ACG		512
Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr		
	10	15
GTG CAG AAG CTG GCA CAC CAG ATC TAC CAG TTC ACA GAT AAG GAC AAG		560
Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys		
	25	30
GAC AAC GTC GCC CCC AGG AGC AAG ATC AGC CCC CAG GGC TAC GGC CGC		608
Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg		
	40	45
CGG CGC CGG CGC TCC CTG CCC GAG GCC GGC CCG GGT CGG ACT CTG GTG		656
Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly Arg Thr Leu Val		
	55	60
TCT TCT AAG CCA CAA GCA CAC GGG GCT CCA GCC CCC CCG AGT GGA AGT		704
Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro Pro Ser Gly Ser		
	75	80
GCT CCC CAC TTT CTT TAGGATTTAG GCGCCCATGG TACAAGGAAT AGTCGCGCAA		759
Ala Pro His Phe Leu		
	90	
GCATCCCGCT GGTGCTCTCC GGGACGAAGG ACTTCCCGAG CGGTGTGGGG ACCGGGCTCT		819
GACAGCCCTG CGGAGACCCT GAGTCCGGA GGCACCGTCC GGCGGCGAGC TCTGGCTTTG		879
CAAGGGCCCC TCCTTCTGGG GGCTTCGCTT CCTTAGCCTT GCTCAGGTGC AAGTGCCCA		939
GGGGGCGGGG TGCAGAAGAA TCCGAGTGTT TGCCAGGCTT AAGGAGAGGA GAAACTGAGA		999
AATGAATGCT GAGACCCCG GAGCAGGGGT CTGAGCCACA GCCGTGCTCG CCCACAAACT		1059
GATTTCTCAC GGCGTGTCAC CCCACCAGGG CGCAAGCCTC ACTATTACTT GAACTTTCCA		1119
AAACCTAAAG AGGAAAAGTG CAATGCGTGT TGTACATACA GAGGTAAC TAATATTTA		1179
AGTTTGTGC TGTCAAGATT TTTTGTGTA CTTCAAATAT AGAGATATTT TTGTACGTTA		1239
TATATTGTAT TAAGGGCATT TTAAGAGCAA TTATATTGTC CTCCCTATT TTAAGACGTG		1299
AATGTCTCAG CGAGGTGTAA AGTTGTTCGC CGCGTGAAT GTGAGTGTGT TTGTGTGCAT		1359
GAAAGAGAAA GACTGATTAC CTCCTGTGTG GAAGAAGGAA ACACCGAGTC TCTGTATAAT		1419
CTATTTACAT AAAATGGGTG ATATGCGAAC AGCAAACC		1457

【 0 1 8 7 】

【 配列番号 : 2 】

配列の長さ : 1 4 9 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

50 起源

生物名：ブタ

存在位置：148..711

配列の特徴

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：CDS

配列

GCGGAACAGC TCGAGCCTTG CCACCTCTAG TTTCTTACCA CAGCTTGGAC GTCGGGGTTT 60
 TGCCACTGCC AGAGGGACGT CTCAGACTTC ATCTTCCCAA ATCTTGGCAG ATCACCOCCT 120
 TAGCAGGGTC TGCACATCTC AGCCGGG ATG AAG CTG GTT CCC GTA GCC CTC ATG 174
 Met Lys Leu Val Pro Val Ala Leu Met
 -90
 TAC CTG GGC TCG CTC GCC TTC CTG GGC GCT GAC ACA GCT CGG CTC GAC 222
 Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp
 -85 -80 -75 -70
 GTG GCG GCA GAG TTC CGA AAG AAA TGG AAT AAG TGG GCT CTA AGT CGT 270
 Val Ala Ala Glu Phe Arg Lys Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg
 -65 -60 -55
 GGA AAA AGA GAA CTT CGG CTG TCC AGC AGC TAC CCC ACC GGG ATC GCC 318
 Gly Lys Arg Glu Leu Arg Leu Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Ile Ala
 -50 -45 -40
 GAC TTG AAG GCC GGG CCT GCC CAG ACT GTC ATT CGG CCC CAG GAT GTG 366
 Asp Leu Lys Ala Gly Pro Ala Gln Thr Val Ile Arg Pro Gln Asp Val
 -35 -30 -25
 AAG GGC TCC TCT CGC AGC CCC CAG GCC AGC ATT CCG GAT GCA GCC CGC 414
 Lys Gly Ser Ser Arg Ser Pro Gln Ala Ser Ile Pro Asp Ala Ala Arg
 -20 -15 -10
 ATC CGA GTC AAG CGC TAC CGC CAG AGT ATG AAC AAC TTC CAG GGC CTG 462
 Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu
 -5 1 5 10
 CGG AGC TTC GGC TGT CGC TTT GGG ACG TGC ACC GTG CAG AAG CTG GCG 510
 Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala
 15 20 25
 CAC CAG ATC TAC CAG TTC ACG GAC AAA GAC AAG GAC GGC GTC GCC CCC 558
 His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Gly Val Ala Pro
 30 35 40
 CGG AGC AAG ATC AGC CCC CAG GGC TAC GGC CGC CGG CGC CGA CGC TCT 606
 Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser
 45 50 55
 CTG CCC GAA GCC AGC CTG GGC CGG ACT CTG AGG TCC CAG GAG CCA CAG 654
 Leu Pro Glu Ala Ser Leu Gly Arg Thr Leu Arg Ser Gln Glu Pro Gln
 60 65 70 75
 GCG CAC GGG GCC CCG GCC TCC CCG GCG CAT CAA GTG CTC GCC ACT CTC 702
 Ala His Gly Ala Pro Ala Ser Pro Ala His Gln Val Leu Ala Thr Leu
 80 85 90
 TTT AGG ATT TAGGCGCTA CTGTGGCAGC AGCGAACAGT CGCGCATGCA 751
 Phe Arg Ile
 TCATGCCGGC GCTTCCTGGG GCGGGGGGCT TCCCGGAGCC GAGCCCCTCA GCGGCTGGGG 811
 CCCGGGCAGA GACAGCATTG AGAGACCGAG AGTCCGGGAG GCACAGACCA GCGGCGAGCC 871
 CTGCATTTTC AGGAACCCGT CCTGCTTGA GGCAGTGTTC TCTTCGGCTT AATCCAGCCC 931
 GGGTCCCGG GTGGGGGTGG AGGGTGCAGA GGAATCCAAA GGAGTGT CAT CTGCCAGGCT 991
 CACGGAGAGG AGAAACTGCG AAGTAAATGC TTAGACCCCG AGGGGCAAGG GTCTGAGCCA 1051
 CTGCCGTGCC GCCCACAAAC TGATTCTGA AGGGGAATAA CCCCACAGG GCGCAAGCCT 1111

37

38

CACTATTACT TGAACCTTCC AAAACCTAGA GAGGAAAAGT GCAATGTATG TTGTATATAA 1171
 AGAGGTAACAT ATCAATATTT AAGTTTGTG CTGTCAAGAT TTTTTFGT AACTTCAAAT 1231
 ATAGAGATAT TTTTGTACGT TATATATTGT ATTAAGGGCA TTTTAAAACA ATTGTATTGT 1291
 TCCCCTCCC TCTATTTTAA TATGTGAATG TCTCAGCGAG GTGTAACATT GTTGCTGCG 1351
 CGAAATGTGA GAGTGTGTGT GTGTGTGTGC GTGAAAGAGA GTCTGGATGC CTCTGGGGA 1411
 AGAAGAAAAC ACCATATCTG TATAATCTAT TTACATAAAA TGGGTGATAT GCGAAGTAGC 1471
 AAACCAATAA ACTGTCTCAA TG 1493

【0188】

【配列番号：3】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CARTCNATGA AYAAYTTYCA RGG

23

【0189】

【配列番号：4】

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CARAGYATGA AYAAYTTYCA RGG

23

【0190】

【配列番号：5】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACNCCRTCYT TRTCYTTRTC

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のヒト褐色細胞腫由来のアドレノメデュリンのアミノ酸配列を示す図である。RE1からRE6は、このアミノ酸配列をアルギニルエンドペプチドダーゼで切断した場合に生成される断片を表す。

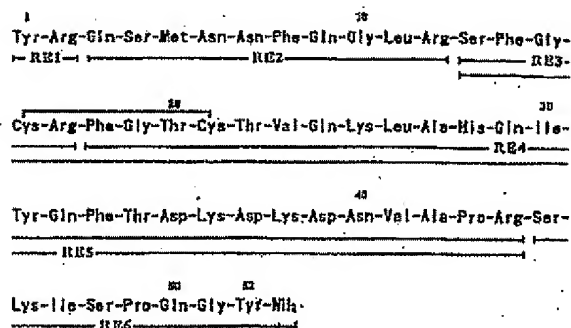
【図2】本発明のヒト褐色細胞腫由来のアドレノメデュリン (AM)、CGRP、CGRP II、およびアミリン (amy) の

アミノ酸配列の比較図である。

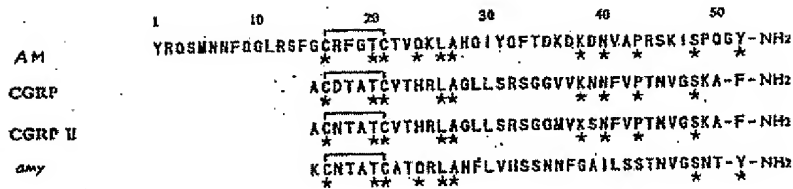
【図3】本発明のヒト褐色細胞腫由来のアドレノメデュリンあるいはCGRPを、麻酔したラットに静脈内単回投与した場合の血圧変動を示す図である。

30 【図4】本発明のヒト褐色細胞腫由来のアドレノメデュリンを、麻酔したラットに静脈内単回投与した場合の、各種血流力学的パラメーターの変動を示す図である。

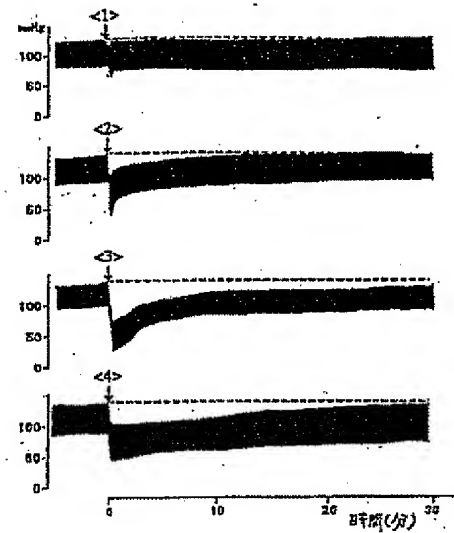
【図1】



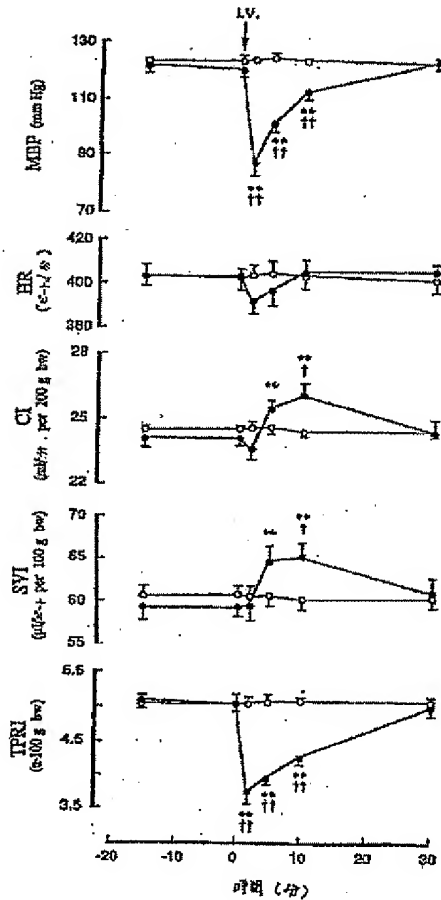
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/02

21/08

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/53

C 9282-4B

9161-4B

A 9453-4B

D

(72) 発明者 江藤 胤尚

宮崎県宮崎市学園木花台南 2 丁目 6 - 13